云南边境地区果实蝇属种类 DNA 条形码鉴定

尤　欢[1,2], 周力兵[1,2,*], 邓裕亮[3], 陈国华[1,*]

(1. 云南农业大学植物保护学院, 昆明 650221; 2. 云南出入境检验检疫局, 昆明 650228;
3. 西双版纳出入境检验检疫局, 云南景洪 666100)

摘要:【目的】果实蝇属 *Bactrocera* 中有国际上重要的检疫性害虫, 基于形态的物种鉴定有一定的局限性。另一方面, 云南边境地区为东南亚地区实蝇入侵我国的重要通道。因此, 对该地区实蝇分子鉴定方法的研究对于该属物种的快速准确鉴定具有重要意义。本研究旨在探讨 DNA 条形码技术在果实蝇属物种鉴定中的有效性。【方法】使用线粒体基因 *COI* 和 *COII* 序列的通用引物对果实蝇属 20 个物种 60 份样品进行 PCR 扩增、测序和序列分析; 采取距离方法和建树方法评价 2 种序列的鉴别能力。【结果】*COI* 和 *COII* 序列平均长度分别为 682 bp 和 339 bp, 种内和种间遗传差异较大, 有较明显的遗传距离间隔(barcoding gap), 鉴定成功率分别为 91.2% 和 90.7%。另外, 分子系统树表明华实蝇亚属 *Sinodacus* 不是单系群。【结论】*COI* 和 *COII* 序列均能够将绝大多数果实蝇属物种进行准确鉴别, 应用 *COI* 或 *COII* 序列进行果实蝇属物种鉴定具有一定的可行性。

关键词: 双翅目; 实蝇科; 果实蝇属; DNA 条形码; COI 基因; COII 基因; 物种鉴定
中图分类号: Q969　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 0454-6296(2014)11-1343-08

Identification of *Bactrocera* species from the border areas of Yunnan province, southwestern China using DNA barcoding (Diptera: Tephritidae)

YOU Huan[1,2], ZHOU Li-Bing[1,2,*], DENG Yu-Liang[3], CHEN Guo-Hua[1,*] (1. College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650221, China; 2. Yunnan Entry-Exit Inspection and Quarantine, Kunming 650228, China; 3. Xishuangbanna Entry-Exit Inspection and Quarantine, Jinghong, Yunnan 666100, China)

Abstract:【Aim】A lot of *Bactrocera* species are important international quarantine pests. However, intra-specific morphological variation can become a serious limitation for the correct identification at the species level. The border areas of the Yunnan province, southwestern China are an important channel of invasion for Southeast Asian fruit fly. Developing a new method for identification of the fruit fly species has important significance for the rapid and accurate identification of the species. The aim of this study was to explore the effectiveness of species identification of DNA barcoding technology in the genus *Bactrocera*.【Methods】In this study, sixty samples from twenty species of *Bactrocera* were tested. Two mtDNA sequences, *i. e.*, *COI* and *COII* sequences, were amplified and sequenced. The species identification efficiency for the two barcodes was assessed by distance-based method and neighbor-joining method.【Results】The average length of *COI* and *COII* sequences was 682 bp and 339 bp, respectively. There existed high intra-specific and inter-specific genetic variability and significant barcoding gap. The rates of successful identification with *COI* and *COII* sequences were 91.2% and 90.7%, respectively. The phylogenetic analyses suggest that the subgenus *Sinodacus* is not a monophyletic group.【Conclusion】COI and COII genes can be used to correctly identify the most species of *Bactrocera*.

Key words: Diptera; Tephritidae; *Bactrocera*; DNA barcoding; COI gene; COII gene; species identification

果实蝇属 *Bactrocera* 隶属于双翅目(Diptera)实蝇科(Tephritidae), 主要分布于亚洲热带、亚热带和暖温带以及澳大利亚和南太平洋地区, 少数种类分布于非洲南部和夏威夷群岛, 世界已知约 470 种,

基金项目: 国家质检总局行业公益项目(201010042)
作者简介: 尤欢, 女, 1988 年生, 湖南长沙人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫分类与系统发育, E-mail: youhuan@outlook.com
* 通讯作者 Corresponding authors, E-mail: zhoulibingciq@sina.cn; chenghkm@126.com
收稿日期 Received: 2014-04-25; 接受日期 Accepted: 2014-10-19

我国已知 46 种（Wang，1996；汪兴鉴等，2008）。果实蝇属中有国际上重要的检疫性害虫，这些种类不仅危害多种热带果蔬，还极易随受害瓜果的运输向疫区外传播。目前对果实蝇种类的鉴定主要根据成虫的形态特征，但受限于虫态以及鉴定人员的经验水平，对检疫质量和通关速度造成很大影响，分子生物学技术的发展为果实蝇属分类鉴定提供了更加快速有效的方法。

Hebert 等(2003b)提出使用线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I（mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I，COI）基因作为全球生物编码序列引发了全球 DNA 条形码鉴定热潮。随着 DNA 条形码研究的不断深入，*COI* 片段在某些类群中并不能进行准确的物种鉴定，多基因条形码研究成为 DNA 条形码分类新的发展方向（Frézal and Leblois，2008），如 COII，NADH 和 ITS 基因等。

目前我国已开展的实蝇条形码研究以 COI 基因为主，涉及果实蝇属种类最多为 25 种（范京安等，2009；梁亮等，2011；刘慎思等，2012）。在理论上都表明 *COI* 条形码对实蝇种类有一定的鉴定能力，但还是对某些形态相似的种类无法进行鉴别（刘慎思等，2012）。云南边境地区特殊的地理环境和多样的生物资源使其成为东南亚地区的实蝇入侵我国的重要通道，同时给实蝇的检验检疫工作带来巨大的挑战。本研究在正确鉴定样本种类的前提下，利用 *COI* 和 *COII* 两对条形码序列对云南边境地区果实蝇属种类进行分析鉴定，一方面验证 DNA 条形码技术对果实蝇属种类鉴定的准确性，另一方面为果实蝇属 DNA 条形码研究提供新的选择。

1　材料和方法

1.1　供试材料

本研究所用材料包括果实蝇属 5 个亚属 20 种 60 份样品，主要来源于云南省各个口岸检疫截获的实蝇标本，边境监测诱捕的实蝇标本,实验室饲养的实蝇标本,相关高校和科研单位赠送的实蝇标本，所有样本的详细信息见表 1。

1.2　总 DNA 的提取

由于标本采集的年限不同，保存情况各异，在拍照存证后取前胸背板右侧足进行 DNA 提取，5 年以内标本使用 TIANamp Genomic DNA Kit，5 ~ 10 年的标本使用 ABI 公司 AM1836 核酸抽提试剂盒。DNA 提取溶液一式两份，置 -20℃ 冷冻保存，后续实验取一份直接用于 PCR 实验。

1.3　PCR 扩增与测序

选取通用 DNA 条形码 *COI* 和 *COII* 对 20 种果实蝇属样本进行研究，引物和扩增程序见表 2。为确保序列的准确性，所有序列进行双向测序。

1.4　序列处理与分析

首先，将获得的序列用 Chroma 2 软件进行阅读和人工校阅，然后用 Sequencher 4.14 软件将正反测序结果进行合并，以确保序列的高质量。所获得序列经校对后，序列的边界根据 GenBank 中的近缘种序列进行确定。然后通过 MEGA 5.05 软件（Katoh *et al*.，2005）中 ClustalW 对序列进行排列，计算所有获得的序列的长度、GC 含量、多态位点、简约信息位点等参数。同时以 Kimura 2 parameter 双参数模型计算种内与种间的遗传距离，并将得到的种内、种间距离绘制成柱状图。利用 Taxon DNA 软件（Meier *et al*.，2006）中的“best match”和“best close match”模块，观察片段的物种鉴定结果。以 NCBI 数据库中地中海果蝇 *Ceratitis capitata*（DQ116368）和芒果小条实蝇 *Ceratitis cosyra*（AY788421）为外类群，使用 PAUP 4.0b10 软件（Swofford，2002）构建 NJ 树（neighbor-joining），观察片段的物种鉴定结果。NJ 法的分支树的可信度使用自展法（Bootstrap）检验，经 1 000 次重复抽样检验得到分支树节点的支持率。

2　结果

2.1　果实蝇属 *COI* 和 *COII* 序列特征

本研究获得 20 种果实蝇的 *COI* 序列（KJ753900 ~ KJ753956）和 *COII* 序列（KJ753957 ~ KJ754010）。其中 *COI* 序列 57 条，平均长度为 682 bp，碱基的平均组成为：T = 34.7%，C = 19.5%，A = 28.3%，G = 17.5%，其中 A + T 含量偏高，为 63.0%。将获得的所有 *COI* 序列进行比对，发现存在多态位点 241 个，简约信息位点 227 个，分别占总长度的 35.3% 和 33.3%。同时获得 20 种果实蝇的 *COII* 序列 54 条，比对后长度为 339 bp，碱基的平均组成为：T 31.7%，C 17.1%，A 36.1%，G 15.1%，其中 A + T 含量明显偏高，为 67.8%。54 条 *COII* 序列包括多态位点 103 个，简约信息位点 95 个，分别占总长度的 30.4% 和 28.0%。结果表明，*COI* 和 *COII* 碱基组成表现出明显的碱基偏向性，这种高AT含量的特性，是昆虫线粒体基因碱

表 1　截获或采自云南边境地区的供试实蝇样本信息

Table 1　Fruit fly species collected or intercepted from the border areas of Yunnan province, southwestern China and used in this study

种类 Species	来源 Origin	采集地点 Collecting locality	采集时间 Collecting date	个体数量 Number of individuals	GenBank 登录号 GenBank accession number	
					COI	*COII*
滇寡鬃实蝇 *Bactrocera*（*Asiadacus*）*modica*	诱捕 Trapped	云南西双版纳 Xishuangbanna，Yunnan，China	2008	2	KJ753900，KJ753901	KJ753957，KJ753958
二颜带实蝇 *B.*（*Zeugodacus*）*cilifera*	诱捕 Trapped	云南勐腊 Mengla，Yunnan，China	2012.5	2	KJ753902 – KJ753904	KJ753959 – KJ753962
	诱捕 Trapped	云南麻栗坡 Malipo，Yunnan，China	2009	1		
	诱捕 Trapped	泰国 Thailand	2001	1		
番石榴实蝇 *B.*（*Bactrocera*）*correcta*	饲养 Reared	云南昆明 Kunming，Yunnan，China	2012.9	1	KJ753905 – KJ753909	KJ753963 – KJ753964
	截获 Intercepted	缅甸 Myanmar	2009.5	1		
	诱捕 Trapped	云南芒市 Mangshi，Yunnan，China	2012.4	1		
	截获 Intercepted	缅甸 Myanmar	2009.6	1		
	截获 Intercepted	孟加拉 Bengal	2009.6	1		
桔小实蝇 *B.*（*Bactrocera*）*dorsalis*	诱捕 Trapped	云南蒙自 Mengzi，Yunnan，China	2012.12	1	KJ753910，KJ753911	KJ753965，KJ753966
	诱捕 Trapped	云南安宁 Anning，Yunnan，China	2009.6	1		
辣椒实蝇 *B.*（*Bactrocera*）*latifrons*	截获 Intercepted	泰国 Thailand	2006.7	2	KJ753912 – KJ753916	KJ753967 – KJ753971
	截获 Intercepted	泰国 Thailand	2006.7	2		
	诱捕 Trapped	云南建水 Jianshui，Yunnan，China	2009.6	1		
木瓜实蝇 *B.*（*Bactrocera*）*papayae*	诱捕 Trapped	云南元江 Yuanjiang，Yunnan，China	2012	1	KJ753917 – KJ753922	KJ753972 – KJ753977
	赠送 Gift	中国检验检疫科学研究院 Chinese Academy of Inspection and Quarantine（CAIQ），China	2010	2		
	饲养 Reared	云南蒙自 Mengzi，Yunnan，China	2012.6	3		
锈实蝇 *B.*（*Bactrocera*）*rubigina*	诱捕 Trapped	云南版纳 Banna，Yunnan，China	2008	1	KJ753923，KJ753924	KJ753978，KJ753979
	诱捕 Trapped	云南河口 Hekou，Yunnan，China	2006	1		
瑞丽果实蝇 *B.*（*Bactrocera*）*ruiliensis*	诱捕 Trapped	云南文山 Wenshan，Yunnan，China	2012.4	1	KJ753925 – KJ753927	KJ753980，KJ753981
	诱捕 Trapped	云南芒海 Manghai，Yunnan，China	2010.9	1		
	诱捕 Trapped	云南望天树 Wangtianshu，Yunnan，China	2010.7	1		
瘤胫实蝇 *B.*（*Bactrocera*）*tuberculata*	截获 Intercepted	老挝楠塔 Nantucket，Laos	2010	1	KJ753928 – KJ753929	KJ753982 – KJ753984
	诱捕 Trapped	云南瑞丽 Ruili，Yunnan，China	2002	1		
	诱捕 Trapped	云南瑞丽 Ruili，Yunnan，China	2008	1		

续表 1 Table 1 continued

种类 Species	来源 Origin	采集地点 Collecting locality	采集时间 Collecting date	个体数量 Number of individuals	GenBank 登录号 GenBank accession number	
					COI	*COII*
B. (*Bactrocera*) *umbrosa*	截获 Intercepted	泰国 Thailand	2008	2	KJ753930, KJ753931	KJ753985, KJ753986
异颜果实蝇 *B.* (*Paratridacus*) *diversa*	诱捕 Trapped 诱捕 Trapped	云南芒市 Mangshi, Yunnan, China 云南勐腊 Mengla, Yunnan, China	2010.9 2005.6	1 2	KJ753932 – KJ753934	KJ753987 – KJ753989
何氏华实蝇 *B.* (*Sinodacus*) *hochii*	诱捕 Trapped 诱捕 Trapped	云南版纳 Banna, Yunnan, China 云南版纳 Banna, Yunnan, China	2012.6 2004.9	1 5	KJ753935 – KJ753940	KJ753990 – KJ753995
四鬃华实蝇 *B.* (*Sinodacus*) *quaterna*	诱捕 Trapped 截获 Intercepted	云南河口 Hekou, Yunnan, China 越南 Vietnam	2012.7 2008.7	1 1	KJ753949, KJ753950	KJ754005
B. (*Sinodacus*) *infesta*	诱捕 Trapped	云南望天树 Wangtianshu, Yunnan, China	2010.8	1	KJ753954	KJ754005
拟黑颜实蝇 *B.* (*Zeugodacus*) *proprediaphora*	诱捕 Trapped 诱捕 Trapped	云南望天树 Wangtianshu, Yunnan, China 云南勐腊 Mengla, Yunnan, China	2012.3 2008	1 1	KJ753951	KJ753996, KJ753997
具条实蝇 *B.* (*Zeugodacus*) *scutellata*	诱捕 Trapped 诱捕 Trapped 诱捕 Trapped 诱捕 Trapped	云南蒙自 Mengzi, Yunnan, China 云南望天树 Wangtianshu, Yunnan, China 云南华宁 Huaning, Yunnan, China 云南河口 Hekou, Yunnan, China	2012.5 2011.3 2011 2002	1 1 1 1	KJ753943 – KJ753946	KJ754001
南瓜实蝇 *B.* (*Zeugodacus*) *tau*	诱捕 Trapped	云南文山 Wenshan, Yunnan, China	2012.10	2	KJ753947, KJ753948	KJ754002, KJ754003
缅甸颜带实蝇 *B.* (*Zeugodacus*) *incisa*	诱捕 Trapped 诱捕 Trapped	老挝楠塔 Nantucket, Laos 云南勐腊 Mengla, Yunnan, China	2010.6 2009.6	1 1	KJ753941, KJ753942	KJ754004
瓜实蝇 *B.* (*Zeugodacus*) *cucurbitae*	诱捕 Trapped	云南文山 Wenshan, Yunnan, China 云南勐腊 Mengla, Yunnan, China	2012.10 2009.1	1 1	KJ753952, KJ753953	KJ754007, KJ754008
近黑颜实蝇 *B.* (*Zeugodacus*) *paratra*	诱捕 Trapped	云南河口 Hekou, Yunnan, China 云南勐星 Mengxing, Yunnan, China	2008 2010.8	1 1	KJ753954, KJ753955	KJ754009, KJ754010

表 2　PCR 所用引物序列及扩增程序

Table 2　Primer sequences and PCR protocols used in this study

基因 Gene	引物名称 Primer name	引物序列(5′-3′) Primer sequences	反应程序 Protocols	文献 References
COI	LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTG	94℃ 3 min; [40 cycles: 94℃ 50 s; 50℃ 50 s; 72℃ 45 s]; 72℃ 10 min	Folmer *et al*., 1994
	HC02198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA		
COII	C2-P1	CAAATTCGAATTTTAGTAACAGC	94℃ 2 min; [40 cycles: 94℃ 45 s; 46℃ 45 s; 72℃ 45 s]; 72℃ 7 min	Smith *et al*., 2003
	C2-P2	TTAGTTTGACAWACTAATGTTAT		

基组成的一种共性(Simon *et al*., 1994)。同时 *COI* 和 *COII* 在实蝇属这个类群中的变异丰富，且 *COI* 和 *COII* 的变异所占总长度的百分比较为接近(表 3)。

表 3　截获或采自云南边境地区的供试实蝇样本的 *COI* 和 *COII* 序列特征

Table 3　The characteristics of *COI* and *COII* sequences of the fruit fly species collected or intercepted from the border areas of Yunnan province, southwestern China and used in this study

基因 Gene	长度(bp) Length	GC 含量(%) GC content	多态位点 Polymorphic sites	信息位点 Parsimony informative sites
COI	682	37.1	241	227
COII	339	32.3	103	95

2.2　*COI* 和 *COII* 在实蝇种内种间变异情况

Kimura 2-parameter 双参数模型为生物条形码协会(Consortium for the Barcode of Life, CBOL)推荐的遗传距离计算方法，本研究采用 Kimura 2-parameter 双参数模型统计 20 种实蝇的种内与种间遗传距离(表 4)。*COI* 序列的种内遗传距离(单一样本不进行种内遗传距离计算)为 0.000～0.036，平均为 0.006，个别种的种内 K2P 距离大于 2%；种间遗传距离为 0.005～0.213，平均为 0.154，个别种种间 K2P 距离小于 2%。*COII* 序列的种内遗传距离为 0.000～0.009，平均为 0.003，种内 K2P 距离均小于 2%；种间遗传距离为 0.006～0.191，平均为 0.116，个别种种间 K2P 距离小于 2%。

表 4　*COI* 和 *COII* 在实蝇种间和种内遗传距离统计结果

Table 4　The statistical results of inter-specific and intra-specific genetic distances of *COI* and *COII* in fruit flies

基因 Gene	种内遗传距离 Intra-specific genetic distance			种间遗传距离 Inter-specific genetic distance		
	最小值 Minimum	最大值 Maximum	平均值 Average	最小值 Minimum	最大值 Maximum	平均值 Average
COI	0.000	0.036	0.006	0.005	0.213	0.154
COII	0.000	0.009	0.003	0.006	0.191	0.116

根据 *COI* 和 *COII* 种内与种间遗传距离做出 barcoding gap 图(图 1)。从种内、种间变异的分布图看出，*COI* 和 *COII* 序列种内变异和种间变异重合较少，种内与种间变异分布呈两边分开的趋势。

2.3　*COI* 和 *COII* 在实蝇属物种中的鉴定效果

Taxon DNA 软件中的“best match”算法，为一个序列搜索最相近的 barcode 序列，如果搜索结果都来源于同一物种，则认为该鉴定成功；相反，如果搜索结果来源于其他的物种则该鉴定失败；如果既包括正确物种又包括其他物种，则认为该鉴定是模糊的。在计算“best close match”前需要得出根据种内遗传距离计算出的距离阈值，然后再根据预先设定的阈值进行分析，没有搜索到任何匹配的序列则认为是“no match”(Meier *et al*., 2006)。本研究利用 Taxon DNA 软件计算 *COI* 和 *COII* 在实蝇属类群中的鉴定成功率(表 5)，结果表明，*COI* 和 *COII* 两个序列的鉴定能力相近，样品鉴定成功率分别为 91.2% 和 90.7%。

表 5　基于“best match”和“best close match”的物种鉴别率(%)

Table 5　Identification success rate (%) based on “best match” and “best close match”

基因 Gene	“Best match”			“Best close match”			
	成功鉴定 Successful identification	模糊鉴定 Ambiguous identification	错误鉴定 Misidentification	成功鉴定 Successful identification	模糊鉴定 Ambiguous identification	错误鉴定 Misidentification	不匹配 No match
COI	91.2%	1.8%	7.0%	91.2 %	1.8%	6.3%	1.7%
COII	90.7%	0.0%	9.3%	90.7%	0.0%	2.7%	6.6%

另一方面，本研究通过物种系统进化关系重建来评估 *COI* 和 *COII* 的物种鉴定效果(图 2)，当同一个物种的不同样本聚在一起时认为该物种可以被正确鉴定，当不同的物种聚在一起时则认为不能够

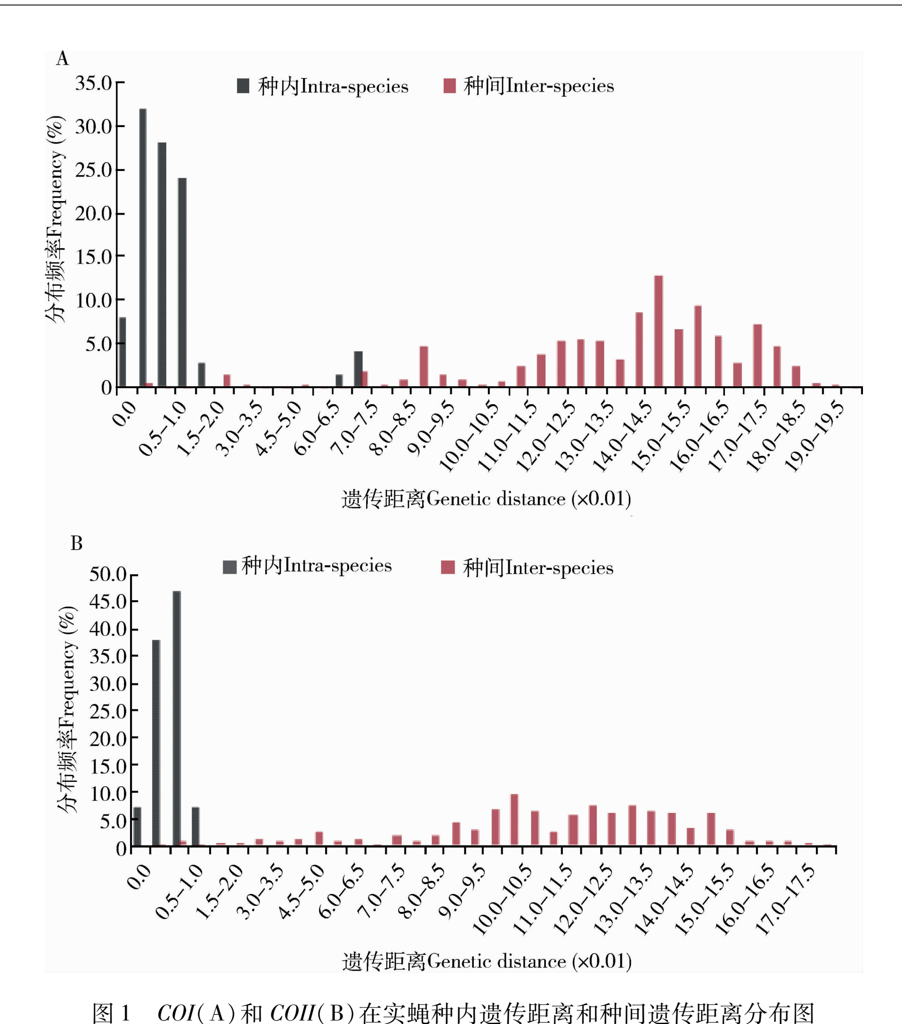


图 1 *COI*(A)和 *COII*(B)在实蝇种内遗传距离和种间遗传距离分布图

Fig. 1 Relative distribution of the intra-specific divergence and the inter-specific K2P distances of *COI* (A) and *COII* (B) among congeneric species of fruit flies

正确鉴定。结果显示，在 *COI* 与 *COII* 构建的 NJ 系统树中，除桔小实蝇 *B.*（*B.*）*dorsalis*、木瓜实蝇 *B.*（*B*）*papayae* 没有单独聚为一支以及 *B.*（*S.*）*infesta* 分支支持率较低外，其余 17 种果实蝇各自聚为一支，分支支持率高。此外，华实蝇亚属 *Sinodacus* 中的 3 种实蝇包括何氏华实蝇 *B.*（*S.*）*hochii*、四鬃华实蝇 *B.*（*S.*）*quaterna* 以及 *B.*（*S.*）*infesta*，它们在 NJ 分子系统树上并没有聚为单系群，与果实蝇 *Bactrocera* 亚属也没有聚在一起。

3 讨论

进行 DNA 条形码分析时，种内、种间遗传距离是进行物种鉴定的重要依据，Hebert 等(2003a)提出利用 *COI* 序列进行物种鉴定的最小种间遗传距离为 2%，且种间遗传距离要达到种内遗传距离的 10 倍。在本研究中，20 种果实蝇的 *COI* 种内和种间平均遗传距离分别为 0.6% 和 15.4%；*COII* 种内和种间的平均遗传距离分别为 0.3% 和 11.6%。*COI* 与 *COII* 种间平均遗传距离均大于 10 倍的种内平均遗传距离，表明利用这两个线粒体基因片段来鉴定果实蝇物种具有可行性。

通过利用距离方法以及建树方法评估 *COI* 和 *COII* 两个序列的鉴定能力，研究结果表明，*COI* 与 *COII* 均能较好地鉴定供试的果实蝇属物种，鉴定成功率分别为 91.2% 和 90.7%。其中，*COI* 和 *COII* 条形码序列均无法成功识别桔小实蝇 *B.*（*B.*）*dorsalis* 与木瓜实蝇 *B.*（*B.*）*papaya*，其种间遗传距离分别为 0.005 和 0.006，在分子系统树上聚为一支。形态上，桔小实蝇和木瓜实蝇极其相似，有研究表明桔小实蝇 *B.*（*B.*）*dorsalis*、木瓜实蝇 *B.*（*B.*）*papaya* 和菲律宾实蝇 *B.*（*B.*）*philippinensis* 可能为一个种(Schutze *et al.*, 2012)，本研究由线粒体 DNA 得到的研究结果支持了传统形态分类的结果。

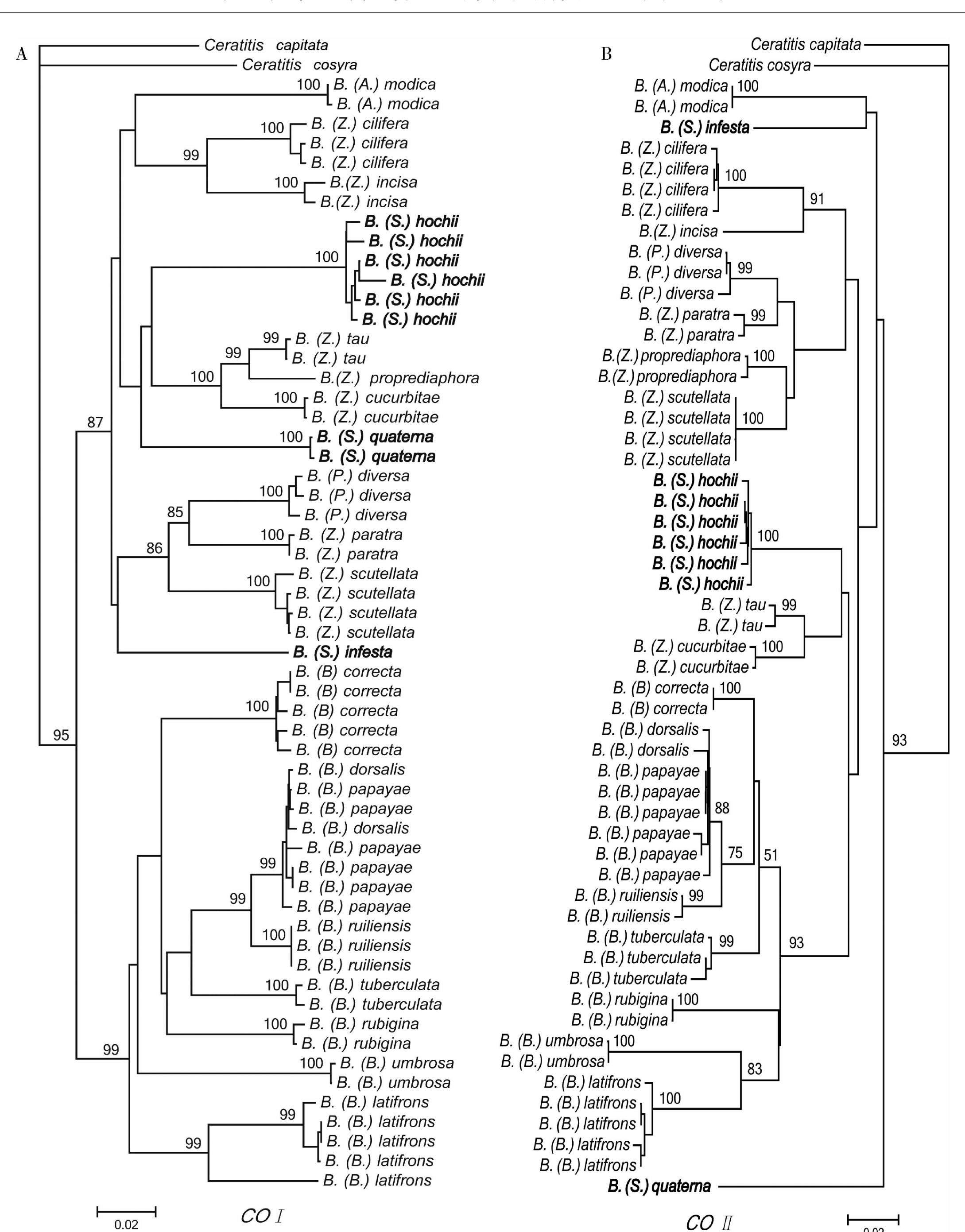


图 2　基于 *COI*(A) 和 *COII*(B) 序列构建的云南边境地区果实蝇属 20 种实蝇的 NJ 树

Fig. 2　The Neighbor-joining tree for 20 species of *Bactrocera* from the border areas of Yunnan province, southwestern China based on *COI* (A) and *COII* (B) sequences

分支上数值示自展检验置信度，只给出大于 50% 的置信度值；标尺示遗传距离；华实蝇亚属物种以粗体显示。The numbers at the nodes indicate the bootstrap values, and only values above 50% are given. Scale bar indicates the genetic distance. The species of *Sinodacus* is indicated in bold.

另外，DNA 条形码不仅能用于物种鉴定，同时也能帮助我们了解物种的系统发育关系。例如，缅甸颜带实蝇 *B.* (*Z.*) *incisa* 和颜带实蝇 *B.* (*Z.*) *cilifera* 形态上非常相似，但通过腹部和翅前缘带的细微差别可以区分这两个种。在 NJ 系统树上，这两个物种形成姐妹支，表明亲缘关系较近，但是仍可以进行准确识别，这与形态分类结果是一致的。华实蝇亚属 *Sinodacus* 是谢蕴贞先生根据其模式种何氏华实蝇 *B.* (*S.*) *hochii* 建立的(赵又新和林小琳，1996)，但是到目前为止，本亚属的分类地位一直有争议。Hering(1952)将它作为 *Callantra* 属的一个亚属；Hardy 和 Adachi(1954)把它归入寡毛实蝇

属 *Dacus* 的 *Strumeta* 亚属(现在的 *Bactrocera* 亚属)。本研究中涉及的 3 种华实蝇，包括何氏华实蝇 *B.*(*S.*) *hochii*、四鬃华实蝇 *B.* (*S.*) *quaterna* 以及 *B.* (*S.*) *infesta*，它们在 NJ 分子系统树上没有聚为单系群，与 *Bactrocera* 亚属也没有聚在一起，这是值得思考的，关于 *Sinodacus* 亚属的分类地位可能还需要进一步分析讨论。由于采样条件的限制，部分物种缺少重复样本个体，关于一些亚属的分类地位分析可能不够全面，因此研究还有待进一步完善。

对于昆虫 DNA 条形码研究来说，目前使用最广泛的 DNA 条形码片段为 *COI* 基因，本文在针对果实蝇属种类的研究中，获得的 *COII* 序列长度只有 330 bp 左右，约 *COI* 基因的一半，较容易扩增，且物种的鉴定效果与 *COI* 基因基本相同，具有较高的应用价值。

致谢　中国科学院动物研究所所陈小琳老师在形态近似种鉴定上提供了帮助,云南出入境检验检疫局技术中心李旻、岳亮亮两位老师以及昆明理工大学周阿涛同志在分子实验和序列分析上给予了帮助，在此一并表示感谢。

参考文献(References)

Chao YS, Lin XL, 1996. Notes on the genus *Sinodacus* Zia (Diptera: Tephritidae) with descriptions of six new species from China. *Entomotaxonomia*, 18(2): 125 - 134. [赵又新, 林小琳, 1996. 华实蝇属的研究及六新种(双翅目: 实蝇科). 昆虫分类学报, 18(2): 125 - 134]

Fan JA, Gu HF, Chen SJ, Mo BH, Wen YQ, He WX, Liu W, Zeng XM, 2009. Sequence analysis of mtDNA-COI gene and molecular phylogeny of fruit fly (Tepbritidae). *Journal of Southwest University (Natural Science Edition)*, 31(10): 88 - 95. [范京安, 顾海丰, 陈世界, 莫帮辉, 温演庆, 何万兴, 刘伟, 曾晓茂, 2009. 实蝇科昆虫 mtDNA-COI 基因序列分析及系统发育研究. 西南大学学报(自然科学版), 31(10): 88 - 95]

Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R, 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome coxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5): 294 - 299.

Frézal L, Leblois R, 2008. Four years of DNA barcoding: current advances and prospects. *Infection Genetic and Evolution*, 8(5): 727 - 736.

Hardy DE, Adachi MS, 1954. Studies in the fruit flies of the Philippines Island, Indonesia, and Malaya Part 1. Dacini (Tephritidae: Diptera). *Pacific Science*, 8(2): 147 - 204.

Hebert PD, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR, 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270: 313 - 321.

Hebert PD, Ratnasingham S, deWaard JR, 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270: S96 - S99.

Hering EM, 1952. Trypetidae (Dipt.) von Sumba und Flores. *Verhandlungen der Naturforschenden Gesellschaft in Basel*, 63: 41 - 43.

Katoh K, Kuma K, Toh H, Miyata T, 2005. MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Research*, 33: 511 - 518.

Liang L, Jiang W, Yu H, Jiang F, Li ZH, Yang D, 2011. Identification of Chinese *Bactrocera* species through DNA barcoding (Diptera, Tephritidae). *Acta Zootaxonomica Sinica*, 36(4): 925 - 932. [梁亮, 江威, 余慧, 姜帆, 李志红, 杨定, 2011. 中国果实蝇属种类的 DNA 条形码鉴定(双翅目, 实蝇科). 动物分类学报, 36(4): 925 - 932]

Liu SS, Zhang GF, Wu Q, Zhang AB, Wang JJ, Wan FH, 2012. Establishment and application of DNA barcoding technology for identification of the immatures and adult debris of *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae). *Acta Entomologica Sinica*, 55(3): 336 - 343. [刘慎思, 张桂芬, 武强, 张爱兵, 王进军, 万方浩, 2012. 桔小实蝇幼体及成虫残体 DNA 条形码识别技术的建立与应用. 昆虫学报, 55(3): 336 - 343]

Meier R, Shiyang K, Vaidya G, Ng PKL, 2006. DNA barcoding and taxonomy in Diptera: a tale of high intraspecific variability and low identification success. *Systematic Biology*, 55(5): 715 - 728.

Schutze MK, Krosch MN, Armstrong KF, Chapman TA, Englezou A, Chomič A, Cameron SL, Hailstones D, Clarke AR, 2012. Population structure of *Bactrocera dorsalis* s. s., *B. papayae* and *B. philippinensis* (Diptera: Tephritidae) in southeast Asia: evidence for a single species hypotheast using mitochondrial DNA and wing-shape data. *BMC Evolutionary Biology*, 12: 130.

Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crspi B, Liu H, Flook P, 1994. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compiliation of conserved PCR primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87(6): 651 - 701.

Smith PT, Kambhampati S, Armstrong KA, 2003. Phylogenetic relationships among *Bactrocera* species (Diptera: Tephritidae) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 26(1): 8 - 17.

Swofford DL, 2002. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Wang XJ, 1996. The fruit flies (Diptera: Tephritidae) of the East Asian Region. *Acta Zootaxonomica Sinica*, 21: 72 - 74.

Wang XJ, Xiao S, Chen XL, Long R, Zhang CL, 2008. Two new species of the genus *Bactrocera* Macquart (Diptera, Tephritidae) from Yunnan, China. *Acta Zootaxonomica Sinica*, 33(1): 73 - 76. [汪兴鉴, 肖枢, 陈小琳, 龙荣, 张朝良, 2008. 云南瑞丽果实蝇属二新种记述(双翅目, 实蝇科, 寡鬃实蝇亚科). 动物分类学报, 33(1): 73 - 76]

(责任编辑: 袁德成)